中国科学: 生命科学 2026 年 第 56 卷 第 4 期: 875 ~ 893
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
评 述 中国知名大学及研究院所专栏 复旦大学生命科学学院100周年专题

抗体发现技术: 从经典到前沿的革新与展望

唐戬, 王鹏飞*

复旦大学生命科学学院, 上海 200438
* 联系人, E-mail: pengfei_wang@fudan.edu.cn

收稿日期: 2025-09-06; 接受日期: 2025-12-09; 网络版发表日期: 2026-03-20
国家自然科学基金(批准号: 32270142, 82572099)和上海市基础研究特区计划-复旦大学项目(批准号: 21TQ1400100(25TQ011))资助

摘要 抗体作为生命科学研究与临床治疗的核心工具, 其发现技术经历了从传统杂交瘤技术到现代高通量、智能化平台的革命性发展. 本文系统回顾了抗体发现技术的主要进展, 首先阐述了奠基性杂交瘤技术的原理、优势与局限, 并介绍了其人源化等改良策略; 随后重点讨论了多种体外展示技术(如噬菌体展示、酵母展示、核糖体展示等)的核心机制、文库构建与筛选策略; 进一步详述了单B细胞抗体发现技术的优势与实施途径, 强调了其在保留天然重轻链配对信息方面的重要性. 本文还深入探讨了下一代测序技术在抗体库解析与动态追踪中的应用, 以及计算生物学与人工智能在抗体设计、优化与可开发性预测中的前沿作用. 此外, 本文还涵盖了针对挑战性靶点的策略、转基因动物平台、双/多特异性抗体的构建及合成生物学方法在新型抗体开发中的潜力. 最后, 通过比较不同技术平台的关键指标, 总结了当前抗体发现领域面临的主要挑战, 并展望了多技术融合、人工智能赋能、个性化抗体开发等未来发展趋势. 本文为抗体药物的研发提供了技术参考与策略指导, 对推动治疗性抗体的创新与临床应用具有借鉴意义.

关键词 抗体发现, 杂交瘤技术, 噬菌体展示, 酵母展示, 单B细胞技术, 下一代测序, 计算辅助设计

抗体, 又称免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig), 是体液免疫中的关键效应分子. 传统的抗体由两条相同的重链和两条相同的轻链通过二硫键共价连接, 形成对称的Y形糖蛋白分子[1]. 每条重链和轻链均包含一个位于氨基末端(N-端)、序列高度可变的可变区, 和一个位于羧基末端(C-端)、序列相对保守的恒定区[2]. 抗体结合抗原的特异性主要取决于可变区内三个序列高度可变的互补决定区(complementarity determining regions, CDRs), 重链和轻链的互补决定区共同构成了抗原结合位点[3,4]. 而抗体的恒定区, 尤其是重链的恒定区, 则负责介导抗体与免疫系统其他组分的相互作用, 从而触发清除病原体、调控免疫应答等效应功能[5,6].

抗体通过多种机制, 在机体抵御外来入侵和维持内环境稳定中发挥着关键作用, 这些机制包括但不限于: 直接中和病原体或毒素[7]; 通过Fc段激活补体级联反应, 使得目标细胞表面形成攻膜复合物, 从而引发补体依赖的细胞毒性作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC)[8]; 通过与效应细胞表面的Fc受体结合, 进而介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 以及抗体依赖的细胞吞噬作用(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)[9,10].

引用格式: 唐戬, 王鹏飞. 抗体发现技术: 从经典到前沿的革新与展望. 中国科学: 生命科学, 2026, 56: 875–893
Tang J, Wang P F. Antibody discovery technology: innovation and outlook from classic to leading edge (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2026, 56: 875–893, doi: 10.1360/SSV-2025-0311

© 2026《中国科学》杂志社 www.scichina.com
https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

抗体发现技术的发展历程如图1所示, 其最初的实践可追溯至早期通过对实验动物进行免疫, 然后从其血清中获得多克隆抗体混合物的方法. 这种方法虽然能够提供针对特定抗原的抗体, 但在特异性、均一性和可持续供应方面存在显著的局限性[11]. 抗体发现技术真正革命性的突破发生在1975年, Georges Köhler和César Milstein[12]成功开创了杂交瘤技术, 通过将产生抗体的B淋巴细胞与永生化的骨髓瘤细胞融合, 首次建立了能够持续、稳定分泌特异性单克隆抗体的细胞系, 这标志着抗体研究与应用进入了一个全新的时代.

继杂交瘤技术这一里程碑之后, 20世纪80年代末及90年代, 分子生物学和基因工程技术的飞速发展催生了多种强大的体外展示技术, 其中以1985年George P. Smith发明的噬菌体展示技术最具代表性[13,14]. 除此之外, 随后相继问世的酵母展示、核糖体展示、细菌展示、哺乳动物细胞展示等技术, 使得科研人员能够构建规模巨大的抗体基因文库, 并从中通过亲和力筛选获得与特定靶点结合的抗体片段, 极大地扩展了抗体发现的来源、提升了筛选通量[15~17].

进入21世纪, 抗体发现领域进一步融入了更为精细、通量更高的技术手段, 特别是单B细胞技术的成熟与广泛应用, 使得研究者能够从免疫个体的血液或组织样本中分离出产生特异性抗体的单个B细胞, 并从中克隆天然配对的重链和轻链可变区基因, 从而高效获取具有体内亲和力的抗体[18]. 此外, 与下一代高通量测序(next-generation sequencing, NGS)技术的深度整合, 不仅提升了对天然免疫系统中B细胞受体(B cell receptor, BCR)或抗体组库的多样性进行深度解析的能力, 也为克隆动态演化的追踪、抗体的人源化和工程化改造提供了前所未有的数据支持[19,20]. 近年来, 人工智能(artificial intelligence, AI)和机器学习(machine learning, ML)的引入, 也为抗体的发现、设计和优化开辟了全新的途径, 其应用范围涵盖了抗体的可开发性预测、表位识别、从头设计乃至生成具有特定功能的抗体序列, 预示着抗体发现技术正加速迈向一个更加智能化、自动化和可预测化的新纪元[21,22].

1 经典的抗体发现技术——杂交瘤技术

1.1 原理与流程

杂交瘤技术是产生单克隆抗体的奠基性经典技术, 该技术的核心原理如图2所示[23].

在经典的杂交瘤制备流程中, 首先要用纯化的目标抗原免疫实验动物, 诱导产生大量的特异性B细胞. 随后, 从实验动物的脾脏或淋巴结中分离出B淋巴细胞, 在促融剂或电融合技术的作用下, 使其与缺乏



图 1 抗体发现技术发展时间轴
Figure 1 Timeline of antibody discovery technology development

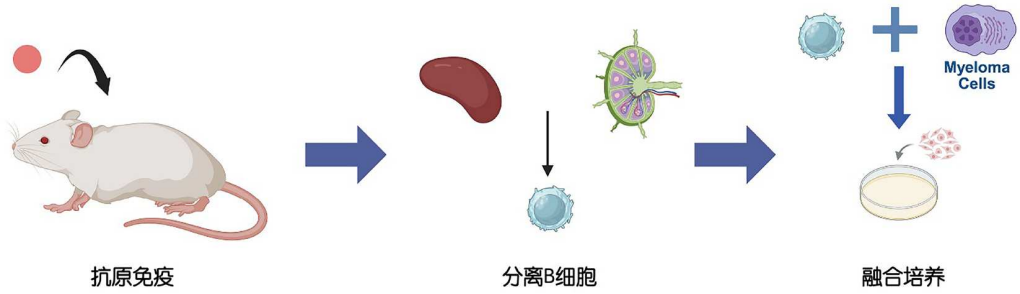


图 2 杂交瘤技术核心原理示意图
Figure 2 Schematic diagram of the core principle of hybridoma technology

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HGPRT)基因的骨髓瘤细胞进行融合[24]，融合后的细胞混合物在含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷的HAT选择培养基中进行培养. 在此条件下，未融合的HGPRT缺陷型骨髓瘤细胞，因脱氧核苷酸的从头合成途径被氨基蝶呤阻断且无法利用补救途径而死亡，未融合的B细胞自身寿命有限，也会逐渐消亡，只有成功融合的、同时具备B细胞的HGPRT酶活性和骨髓瘤细胞的永生能力的杂交瘤细胞，才能在HAT培养基中存活并持续增殖[25,26]. 最终，存活下来的杂交瘤细胞克隆群需要通过ELISA等方法进行鉴定，分离出能够产生特异性抗体的阳性克隆. 这些阳性克隆随后通常通过有限稀释法或单细胞分选技术进行多次亚克隆，从而获得能够长期稳定分泌高质量单克隆抗体的杂交瘤细胞系[27].

1.2 优势

杂交瘤技术的核心优势在于能够产生具有天然重链和轻链配对的完整抗体分子. 这些抗体是在生理条件下由免疫系统筛选出来的，来源于经过体内亲和力成熟的B细胞，经历了体细胞高频突变和严格的克隆选择，因此最终筛选得到的单克隆抗体往往已经具备了较高的抗原结合亲和力[28~30]. 此外，一旦成功获得稳定表达目标抗体的杂交瘤细胞系，便可以实现单克隆抗体的大规模生产，从而满足科学研究或临床药物研发的需求.

因此，即使在各种抗体发现技术百花齐放的今天，杂交瘤技术依然在治疗性抗体领域发挥着重要作用，例如针对耐抗生素的铜绿假单胞菌抗体WVDC-5244[31]、在肿瘤治疗中针对HER3和HER2的双特异性抗体1G5D2[32]、用于治疗缺血性中风的单克隆抗体6H2[33]等.

1.3 局限性

尽管杂交瘤技术具有里程碑意义，但其也存在一定的局限性. 例如，整个流程从动物免疫开始，到最终获得稳定表达的单克隆杂交瘤细胞系，通常耗时长达3~6个月，操作步骤繁琐，劳动强度较大[34]. 而且，杂交瘤技术的筛选通量相对较低，且对于免疫原性较弱的抗原、分子量过小的抗原、在不同物种间高度保守的抗原，或者某些结构特殊的靶点，成功筛选到高质量抗体的效率可能会降低[35]. 更为突出的问题是，传统杂交瘤技术主要产生的鼠源性抗体，在人体内作为治疗性药物应用时，很容易被人体免疫系统识别为外来蛋白，从而引发人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)反应，这不仅会加速抗体的清除，降低疗效，还可能引发过敏反应等副作用，限制了其在临床上的反复使用和长期治疗效果[36,37].

1.4 技术改良与应用

为克服传统鼠源抗体在临床应用中引发的免疫原性问题，研究人员基于基因工程技术开发了一系列抗体人源化的策略，例如通过将鼠源抗体的可变区与人源抗体的恒定区拼接成嵌合抗体，或将鼠源抗体的CDRs移植到人的抗体可变区框架(framework regions, FRs)中，这些方法均能降低鼠源序列的比例，从而减弱其在人体内的异源性[38,39]. 此外，兔源单克隆抗体因其通常具有比鼠源抗体更高的亲和力和更低的免疫原性而受到广泛关注，近年来也取得了重要进展[40,41].

尽管面临着众多新兴技术的激烈竞争，传统的杂交瘤技术凭借其能够直接产生具有天然结构和翻译后修饰的完整IgG分子的独特能力，在生命科学的基础研究中仍然占有一席之地，并常常作为评价其他技术平台所获抗体片段功能的重要手段.

2 体外展示技术

体外展示技术通过将编码蛋白质的基因型与其表达的表型在分子或细胞水平上直接关联起来，实现了在体外对蛋白质库进行大规模的定向筛选，极大地推动了抗体发现、酶工程、受体-配体相互作用研究等多个领域的发展[42]. 在众多体外展示技术中，噬菌体展示技术因其出现早、技术成熟、应用广泛而最具代表性[43].

2.1 噬菌体展示技术

2.1.1 原理

噬菌体展示技术是一种强大的体外选择技术，原理如图3所示. 其核心机制在于将编码外源多肽或蛋白质的基因序列，与噬菌体外壳蛋白(通常是丝状噬菌体如M13，fd或f1的基因Ⅲ蛋白或基因Ⅷ蛋白)的编码基因进行框内融合[44]，目标多肽或蛋白质便会在重组

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

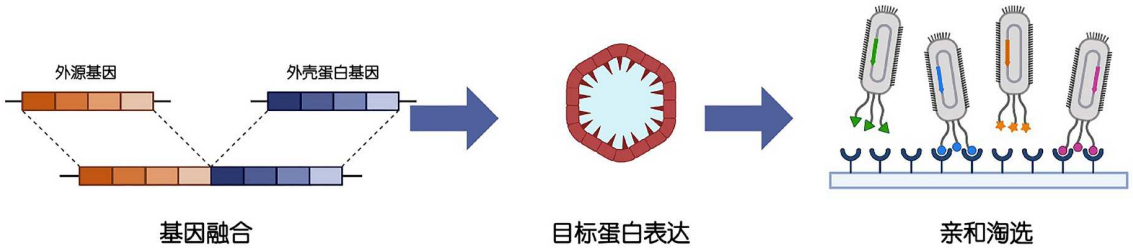


图 3 噬菌体展示技术原理示意图
Figure 3 Schematic diagram of the principle of phage display technology

噬菌体复制和组装的过程中整合到噬菌体的表面[45]. 这种基因型与表型的紧密关联是噬菌体展示技术的基石, 能够通过展示在噬菌体表面的多肽或蛋白质与靶标分子之间的特异性相互作用, 来高效地富集和分离那些具有结合特性的噬菌体, 这一关键的筛选步骤被称为亲和淘选[46].

2.1.2 抗体库的类别

利用噬菌体展示技术进行抗体发现的关键前提, 是构建多样性的抗体基因文库, 根据抗体基因来源和构建策略的不同, 噬菌体抗体库主要可以分为以下几类: (ⅰ) 天然抗体库, 来源于未经特定抗原免疫的健康个体(通常是人, 也可来源于其他物种)的外周血B淋巴细胞、脾脏或骨髓, 其抗体可变区基因通过PCR反应扩增并随机组合后克隆到噬菌体载体中, 理论上这种库代表了该物种几乎完整的抗体可变区基因谱, 能够筛选针对多种类型抗原的抗体[47,48]; (ⅱ) 免疫抗体库, 构建自经特定抗原免疫后的B细胞, 由于经历了体内的免疫应答和亲和力成熟过程, 这类文库中通常富集了针对该免疫原的高亲和力抗体[49]; (ⅲ) 合成抗体库, 通过对天然抗体基因的特定区域进行定点突变而构建, 不仅可以超越天然免疫系统的多样性限制, 还可以对库的序列组成、特定氨基酸的偏好性等进行更为精确的优化[50,51].

2.1.3 筛选策略

噬菌体抗体库的筛选, 是一个多轮的循环过程, 逐步富集能够与目标抗原发生高亲和力结合的噬菌体, 同时去除大量非特异性或低亲和力的噬菌体. 固相筛选是最为常用的筛选方式, 该方法通常将纯化的靶蛋白固定在固相载体的表面, 然后加入噬菌体抗体库进行孵育; 经过充分的洗涤去除未结合或弱结合的噬菌体后, 通过改变pH、加入竞争性配体或酶解等方式洗脱特异性结合的噬菌体, 并用其感染宿主菌进行扩增, 用于下一轮筛选[52]. 液相筛选则允许抗原和噬菌体在溶液中以更接近其天然构象的状态进行结合并孵育, 随后通过磁珠或固相载体进行捕获和分离, 这种方法有助于筛选那些对构象高度敏感的抗体[53]. 细胞筛选是将表达特定靶分子的完整活细胞作为筛选对象, 这种策略尤其适用于筛选针对细胞表面受体、离子通道、转运蛋白等复杂膜蛋白的抗体, 或者那些需要识别天然膜环境中的构象性表位的抗体[54]. 更为复杂的体内筛选策略是将构建好的噬菌体抗体库直接注射到实验动物的血液循环中, 经过一定时间后, 从目标组织、器官或病变部位回收那些能够特异性聚集的噬菌体克隆, 这种方法有助于筛选出不仅具有靶向性, 还可能具有良好组织穿透能力、特定药代动力学特性的抗体[55,56].

2.1.4 优势

噬菌体展示技术作为一种成熟的抗体发现平台, 其主要优势之一在于能够构建容量极大的抗体库, 大大增加了筛选到优质抗体的几率; 并且, 该技术可以直接从人源抗体基因文库中筛选获得全人源抗体, 从而避免后续人源化改造的过程以及免疫原性风险. 此外, 该技术能够有效针对传统方法难以处理的靶点, 例如非免疫原性或低免疫原性的“自身”抗原、对宿主动物具有潜在毒性的分子等, 因为其整个筛选过程完全在体外进行, 摆脱了动物体内免疫系统和生理毒性等限制[57,58]. 噬菌体展示平台还非常便于对抗体进行各种工程化改造, 例如可以构建定点或随机突变的子库, 并进行多轮更严格的筛选, 从而

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

获得特定的抗体变体[59]. 相较于传统的杂交瘤技术, 噬菌体展示通常具有更短的研发周期和相对较低的直接成本, 尤其是在高通量筛选时更具效率和灵活性.

2.1.5 局限性

噬菌体展示技术也存在一些局限性. 首先, 由于抗体片段是在原核表达系统中表达的, 与真核细胞中的天然环境存在差异, 且缺乏真核细胞特有的翻译后修饰, 可能会影响部分抗体的生物学功能, 特别是需要精确糖基化才能发挥完整功能的IgG[28,60]. 其次, 在抗体库的构建和筛选过程中, 某些在噬菌体表面表达水平不高, 或者其序列本身对噬菌体的生长有不利影响的抗体, 可能会在多轮筛选中逐渐丢失, 导致筛选结果偏向那些高表达或对噬菌体系统“友好”的克隆, 而非生物学功能最优的克隆[61]. 最后, 噬菌体表面展示的抗体片段可能与筛选体系中的某些组分发生非特异性结合, 从而导致筛选背景信号较高或出现假阳性克隆, 需要通过优化筛选条件、引入更为严格的筛选策略来克服这些筛选伪影[62].

2.2 酵母展示技术

2.2.1 原理

酵母展示技术是继噬菌体展示之后发展起来的另一种应用广泛的体外高通量筛选平台, 由K. Dane Wittrup和Eric T. Boder于1997年首次成功开发, 原理如图4所示[16,63]. 通过将编码目标蛋白质的基因序列与酵母细胞壁蛋白(最常用的是酿酒酵母的凝集素亚基Aga2p)的编码基因进行融合表达, 使得目标蛋白质作为Aga2p的融合伴侣, 在其分泌途径中被转运并锚定在酵母细胞壁的外表面[64]. 与噬菌体展示技术相似, 酵母展示同样实现了基因型与表型之间的连接, 但其特色在于能够结合流式细胞分选技术(如荧光激活细胞分选, fluorescence-activated cell sorting, FACS), 对展示目标蛋白的酵母群体进行高通量、高灵敏度的定量分析和精细分选[65].

2.2.2 优势

酵母展示技术的一个关键优势在于其利用了真核生物作为蛋白质表达和展示的宿主细胞, 酵母细胞内拥有相对完善的蛋白质折叠和翻译后修饰的分子机器, 有利于复杂抗体的正确折叠和功能性展示, 减少了在原核表达系统中可能遇到的错误折叠或缺乏必要修饰等问题. 此外, 通过使用荧光标记的靶抗原以及能够识别展示蛋白上融合标签的荧光二抗, FACS能够同时定量检测单个酵母细胞表面所展示的抗体片段数量及其与靶抗原的结合信号强度, 甚至可以通过动力学控制实验来评估其解离速率, 从而实现对复杂抗体库中多样化克隆的精确区分和高效富集[66].

2.2.3 应用

酵母展示技术最为广泛的应用之一, 便是通过在酵母表面展示抗体可变区文库, 并利用FACS进行多轮精细的筛选, 从而获得具有强效价的治疗性抗体候选分子[67,68]. 该技术同样被高效地应用于从大规模人源抗体文库中直接筛选具有高亲和力和高特异性的治疗性抗体, 其真核表达系统特别适合于筛选那些需要正确折叠才能发挥功能的重组人源抗体[69]. 此外, 酵母展示还被广泛用于筛选具有更高热稳定性、更好pH耐受性、更优溶解性的抗体变体, 这些特性的改善对于确保抗体药物在研发、生产、储存、临床应用过程中的质量和有效性至关重要[70].

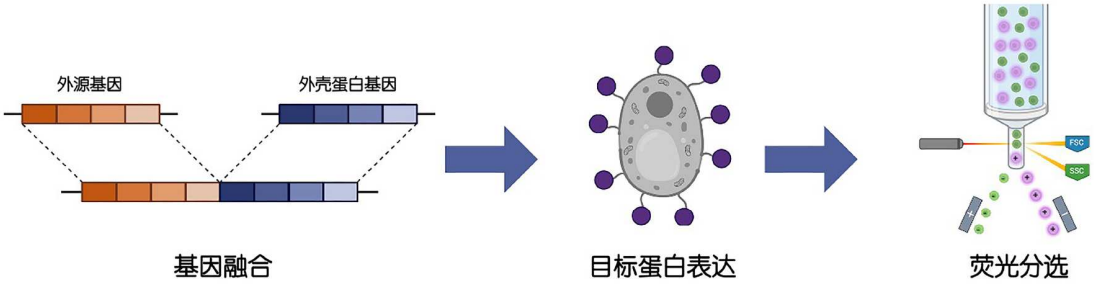


图 4 酵母展示技术原理示意图
Figure 4 Schematic diagram of the principle of yeast display technology

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

2.3 核糖体展示技术

2.3.1 原理

核糖体展示技术是一种完全在体外无细胞环境下进行的, 用于蛋白质展示、筛选和定向进化的高通量技术, 由Andreas Plückthun和Jürgen Hanes于1997年首次成功建立. 该技术的核心原理是利用体外转录-翻译体系, 将编码目标蛋白质的线性DNA或mRNA模板, 在含有核糖体、氨基酸、tRNA以及各种必需的酶和能量因子的反应混合液中进行高效表达[71]. 在设计模板时通常会去除终止密码子, 并在3′端添加一段间隔序列, 使得新合成的多肽链在翻译完成后, 仍能通过其C末端与核糖体及其结合的mRNA分子形成三元复合物[72]. 整个蛋白质的合成过程完全在试管中完成, 无需经过任何细胞转化、培养等步骤[73]. 随后, 包含目标展示蛋白的核糖体复合物文库可以直接与靶标分子进行孵育, 通过特异性的亲和结合作用分离出与靶标结合的核糖体复合物, 然后通过对复合物中的mRNA进行RT-PCR反应来扩增编码目标蛋白的基因序列, 用于下一轮的筛选富集、克隆测序或引入突变进行定向进化[74].

2.3.2 优势

核糖体展示技术最为显著的优势之一在于其能够构建规模巨大的蛋白质文库, 因为其多样性仅受限于起始模板的数量以及体外转录翻译系统的效率, 而无需考虑细胞转化效率这一通常限制细胞展示技术库容量的关键瓶颈[75]. 由于整个蛋白质的合成、筛选以及编码基因的回收和扩增过程均在无细胞环境中进行, 非常便于与各种体外突变策略相结合, 从而进行蛋白质的定向进化; 可以在每一轮筛选富集之后, 对回收的基因进行随机或定向诱变, 再进行下一轮的筛选, 快速积累有利突变, 从而高效地优化目标蛋白质的亲和力、特异性、稳定性等特性[76]. 此外, 该技术完全避免了活细胞的转化和培养步骤, 因此不会受到宿主细胞对于某些外源基因序列的偏好性、表达毒性效应或密码子使用偏倚等因素的影响.

2.3.3 局限性

尽管核糖体展示技术具有上述显著优势, 但在实际操作和应用中也存在一些局限性. 首先, 体外转录翻译体系对环境中痕量的核糖核酸酶污染极为敏感, 核心的mRNA-核糖体-蛋白质三元复合物的稳定性也相对较低, 在操作过程中容易发生解离或降解, 这些因素都可能影响实验结果的稳定性和重复性[77]. 其次, 蛋白质是在体外无细胞环境中合成的, 其折叠环境与真核细胞内的天然环境有所不同, 可能会影响某些蛋白质的稳定性和生物学功能[78]. 最后, 由于核糖体复合物本身尺寸较大, 且表面带有显著的负电荷(主要来自RNA和蛋白质), 在筛选过程中可能更容易与固相载体材料或靶标分子发生非特异性的静电吸附或疏水相互作用, 从而筛选背景信号较高, 需要通过优化筛选缓冲液的组分和洗涤条件来减少假阳性克隆的富集[71].

2.4 其他展示技术

除了前述主流的噬菌体展示、酵母展示和核糖体展示技术外, 还有其他几种各具特色的蛋白质展示技术, 它们在特定应用场景下展现出独特的优势, 进一步丰富了抗体发现的工具箱.

2.4.1 细菌展示技术

细菌展示技术利用细菌的多种细胞表面结构, 如外膜蛋白、脂蛋白、鞭毛蛋白、菌毛蛋白等作为锚定载体, 将目标蛋白质融合表达并展示在细菌表面, 从而实现基因型与表型的连接[79]. 细菌展示的一个显著优势是可以结合流式细胞术进行高通量筛选, 从而根据亲和力大小或展示蛋白的表达水平进行精细的区分和富集[80]. 细菌展示技术已成功应用于抗体片段的筛选与亲和力成熟、重组活疫苗的开发等多个领域, 然而, 其原核表达背景可能导致复杂的真核源蛋白质出现折叠问题或缺乏必要的翻译后修饰, 并且展示的蛋白可能会受到细菌外膜通透性的限制或被细菌自身的蛋白酶降解[81].

2.4.2 哺乳动物细胞展示技术

哺乳动物细胞展示技术是将目标蛋白质, 特别是高度依赖于真核表达系统进行正确加工的蛋白质, 通过基因工程手段表达并锚定在哺乳动物细胞的质膜外表面, 从而在最接近天然生理状态的环境下进行展示和筛选[82]. 该技术最核心的优势在于能够确保展示的目标蛋白质具有天然的折叠构象、正确的二硫键配对以及翻译后修饰, 并允许直接在细胞水平上进行基于

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

生物学功能的筛选[83]. 哺乳动物细胞展示已经成为发现针对复杂膜蛋白靶点抗体的重要工具, 尽管其构建文库的容量和筛选通量相对较低, 且操作成本也更高, 但其筛选结果往往具有更高的生理相关性和更直接的临床转化潜力[84].

3 单B细胞抗体发现技术

3.1 核心思想与优势

尽管传统的杂交瘤技术和各类体外展示技术在过去数十年中极大地推动了单克隆抗体的发现与应用, 但它们各自仍存在一些固有的局限性. 单B细胞抗体发现技术正是在这样的背景下应运而生, 其核心优势在于直接从免疫个体的B细胞库中, 通过高通量的筛选手段, 直接分离并克隆出那些能够产生特异性抗体的单个B淋巴细胞, 特别是记忆B细胞和浆细胞[85,86].

该技术能够准确保留B细胞在生理条件下, 经过复杂的免疫应答后天然形成的重链和轻链的原始配对信息, 从而最大限度地确保了重组表达后的抗体分子能够重现其原有的高亲和力、高特异性以及良好的生物学活性[19,87]. 与经典的杂交瘤技术相比, 单B细胞技术无需进行细胞融合这一低效且随机的过程, 也无需漫长的克隆化培养; 与各类体外展示技术相比, 它避免了构建文库时潜在的序列丢失、表达偏倚或因重链与轻链随机组合而导致的功能丧失等问题[88]. 因此, 单B细胞抗体发现技术的根本目标在于更高效地从天然免疫库中获得具有治疗潜力的抗体, 尤其在应对新发的传染病疫情、筛选针对复杂靶点的抗体等方面, 展现出了显著的优势和巨大的应用前景[89,90].

3.2 主要技术途径

单B细胞抗体发现技术的实施依赖于一系列高效的技术组合, 核心环节通常包括目标B细胞的特异性识别与分离、单个B细胞中抗体基因的获取, 以及后续的基因克隆、表达与功能验证.

3.2.1 基于流式分选的单B细胞分离与抗体克隆

基于流式细胞分选的技术是高通量分离抗原特异性B细胞的经典方法之一, 技术原理如图5所示. 它主要利用荧光标记的特异性抗原和结合多种B细胞表面标志物的荧光抗体组合, 从复杂的细胞混合物中精确识别并分离出特定表型的B细胞[91]. 分选得到的单个B细胞随后被导入PCR反应管或微孔板中进行细胞裂解, 并通过单细胞RT-PCR或巢式PCR等技术, 特异性地扩增其所编码的、天然配对的抗体重链和轻链可变区基因序列[92]. 扩增得到的基因片段通常会通过进一步的PCR拼接, 然后克隆到合适的细胞载体中进行重组抗体的表达与分泌, 最后对培养上清中的抗体进行纯化和功能性检测, 以验证其抗原结合特异性、亲和力及其他生物学活性[93].

目前, 该技术途径已经在流感、新冠等病毒的抗体研究中广泛应用, 其中尤为关键的是特异性抗原探针的设计. 在流感病毒方面, HA-Y98F和NA-R292K突变体是最为重要的抗原探针之一, 它们的特异性构象为开发流感病毒广谱中和抗体提供了关键的帮助[94~96]. 在新冠疫情期间, 基于单B细胞的筛选和纳米级荧光探针的生物传感器系统, 为强效中和抗体的检测和发现提供了强有力的工具[97,98],

3.2.2 微孔板与微流控技术

为了进一步提高单B细胞筛选的通量、降低单个细胞分析的成本、提高检测的灵敏度, 多种基于微孔板或微流控芯片的创新性单B细胞分离与筛选技术相继被开发出来, 并得到了广泛的应用[91]. 基于酶联免疫斑点技术(enzyme-linked immunospot, ELISPOT)及其荧光版本的分析方法, 被广泛用于直接检测和分离那些能够分泌目标抗体的单个B细胞, 其原理通常是在预包被了特异性抗原的微孔板底部培养B细胞悬液, 分泌的抗体被捕获, 随后通过酶促显色反应或荧光标记的二抗进行可视化检测, 从而识别并定位分泌目标抗体的细胞[99,100]. 而微滴微流控技术能够将单个B细胞与细胞裂解液、RT-PCR反应试剂, 以及靶细胞或检测试剂包裹在数以百万计、体积仅为纳升级别的独立油包水微滴反应器中, 从而实现大规模的单细胞培养、抗体分泌功能检测、抗体基因的扩增以及高通量的测序文库构建, 这种技术极大地提升了单B细胞分析的处理速度、通量和灵敏度[101].

3.2.3 B细胞受体测序与重组表达

与上述各种物理分离和功能筛选技术相辅相成的是, 直接对经过富集或分选的抗原特异性B细胞进行B细胞受体基因库的高通量测序, 全面、定量地解析其

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

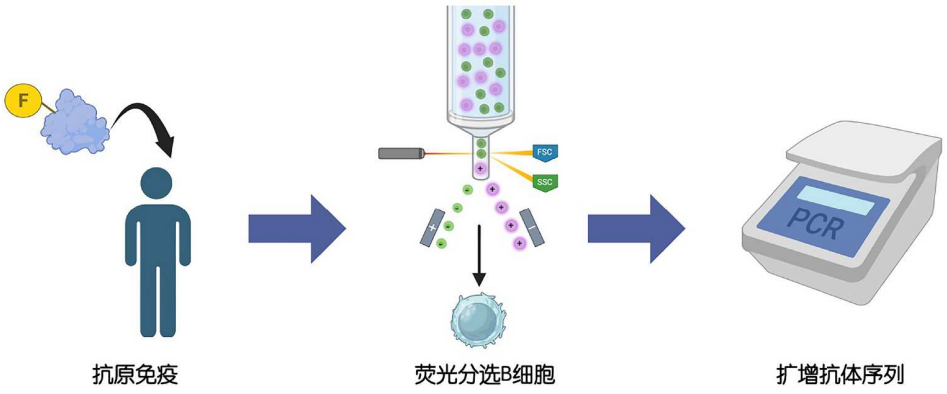


图 5 单B细胞分离技术原理示意图
Figure 5 Schematic diagram of the principle of single B-cell isolation technology

基因的多样性、序列特征、克隆丰度以及体细胞高频突变的模式[102]. 在新冠的研究中, B细胞受体测序结合配体阻断的方法, 可以高效识别多种中和抗体, 大大提高了抗体发现的通量[103]. 从高通量测序中获得的海量序列数据, 通常需要经过一系列复杂的生物信息学分析, 包括原始序列的质量控制、V(D)J基因片段的精确注释、CDR区域的划分、体细胞高频突变模式的分析等, 目的是识别出在免疫应答中占优势的B细胞克隆、追踪特定克隆在免疫过程中的演化路径, 并最终从中挑选出那些具有潜在高亲和力、广谱中和活性或其他期望特性的抗体序列[104].

3.3 挑战与发展

尽管单B细胞抗体发现技术在过去的十几年中取得了令人瞩目的进展, 但仍然面临着一系列有待克服的技术挑战和需要持续探索的发展方向.

目前, 该领域面临的首要技术难题之一仍然是如何更高效地从海量的B细胞群体中准确分离那些数量稀有的特定B细胞, 这直接关系到后续抗体发现的成功率以及获得高质量抗体的可能性. 此外, 在单细胞水平上对抗体基因进行高效、无偏倚的扩增, 并确保其原始配对信息的完整和准确, 尤其是在平行处理大规模的B细胞时, 仍然存在技术上的不确定性和改进空间. 当前, 许多功能强大且高度自动化的单B细胞筛选与分析平台, 其初期的设备购置费用、昂贵的专用试剂耗材, 在一定程度上限制了这些先进技术在资源相对有限的学术实验室或超大规模筛选项目中的普及和常规应用[105].

展望未来, 单B细胞抗体发现技术的一个重要发展方向是与新兴的单细胞多组学技术进行深度融合, 在获取抗体基因序列的同时, 获得该B细胞更为完整的转录表达谱、细胞表面蛋白标志物谱、表观遗传状态等多维度信息, 这将有助于更深入地理解抗体产生的调控机制、更精确地筛选具有特定功能的B细胞亚群[106,107]. 技术的持续创新将进一步推动单B细胞筛选的自动化水平和处理通量的提升, 同时降低单次分析的成本和操作的复杂性, 使之更易于普及[108].

4 下一代测序与计算生物学在抗体发现中的应用

随着基因测序技术和计算能力的飞速发展, 下一代高通量测序技术与计算生物学日益融入抗体发现的各个环节, 极大地提升了抗体药物研发的效率和精度[109].

4.1 NGS驱动的抗体库分析与筛选

下一代测序技术的迅猛发展, 为全面、定量地解析抗体基因组库的多样性与动态变化提供了前所未有的强大工具. 在现代抗体发现的流程中, NGS技术与传统的体外展示技术的结合日益普及, 通过对抗体基因文库进行深度测序分析, 可以精确地追踪和定量评估特定抗体克隆在筛选过程中的富集程度以及动态演化, 从而有效指导筛选策略的调整与优化[110]. 同样地, NGS技术也被广泛整合到单B细胞抗体发现技术中, 无论是对富集得到的特异性B细胞群体进行组库的

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

深度分析, 以快速识别优势克隆和共有序列特征, 还是对从单个B细胞中扩增得到的可变区基因进行高通量测序, 以大规模获取具有天然配对信息的抗体序列, NGS技术的应用都极大地提升了筛选的效率、深度和广度[111].

例如, 基于NGS技术可以开发用于治疗性抗体的辅助设计的平台[112], NGS也可以用于单域抗体的测序与工程化改造[113]、新冠病毒变种的研究[114]等. 总之, NGS技术为新型治疗性抗体的开发与筛选提供了更高效、更全面的手段[115].

然而, 如何从海量、复杂且可能包含技术噪音的抗体序列数据中准确、高效地提取出具有真实生物学意义的信息, NGS仍然面临着生物信息学分析和数据统计解读方面的挑战, 迫切需要不断开发更为先进的分析工具和算法模型[116].

4.2 计算辅助抗体设计与优化

随着生物信息学、结构生物学和计算机科学的飞速发展, 计算生物学方法在现代抗体的设计和优化等方面正发挥着日益重要的作用[117]. 基于已解析的抗原-抗体复合物晶体结构, 或通过计算预测得到的抗体三维模型, 结构导向的抗体设计策略能够利用分子对接模拟、分子动力学模拟以及结合自由能计算等计算化学方法, 分析抗原-抗体相互作用, 并据此改造CDR序列中的关键氨基酸, 以增强与目标抗原的结合亲和力、改变结合特异性、拓展识别新表位的能力或优化其pH敏感性等特性[118].

计算方法在抗体的人源化改造过程中同样重要, 通过对抗体可变区的三维结构进行建模和分析, 可以精确识别鼠源抗体框架区中那些可能影响CDR环构象或抗原结合能力的关键残基并进行保留, 同时最大限度地将其他框架区残基替换为最接近人源种系的基因序列, 在保持原有亲和力和特异性的前提下有效降低抗体在人体内的免疫原性[119].

计算工具也能够高效指导抗体的特异性改造, 例如: 通过建立抗体-抗原复合物的能量函数模型, 可以系统性地预测单个或多个氨基酸残基突变对两者结合自由能的影响, 从而筛选出可能提高亲和力的有益突变; 类似地, 也可以通过计算预测特定氨基酸突变对蛋白质整体稳定性的影响, 以筛选和设计出具有更高热稳定性、更好pH耐受性或更优生物物理特性的抗体[120,121]. 此外, 利用各种计算方法和机器学习模型来预测抗体的“可开发性”——包括其溶解性、在目标缓冲液中的聚集倾向、溶液黏度、潜在的化学降解位点、翻译后修饰位点、非特异性结合倾向等一系列生物物理和化学特性——已成为抗体药物早期筛选流程中的一个重要组成部分, 其目的在于尽早识别并剔除那些具有不良成药性风险的候选分子, 从而提高后续开发的成功率并降低研发成本[122,123].

计算辅助的抗体设计与优化策略目前也存在亟待解决的问题, 如预测精度有待进一步提高、对大规模计算资源的需求较高、实验验证与计算预测之间的反馈循环效率等. 展望未来, 随着更大规模、更高质量实验数据的不断积累, 结合更先进的人工智能算法以及更强大的并行计算能力, 将有望实现更精准、更高效的抗体开发[124].

4.3 人工智能与机器学习的应用

近年来, 人工智能, 特别是其核心分支机器学习技术, 正以前所未有的深度和广度渗透到抗体发现的各个环节, 为解决传统实验方法难以逾越的复杂问题, 加速研发进程以及提高成功率提供了数据驱动的新工具[125]. AI算法能够高效地从抗体序列库中识别有意义的序列, 进行精确的克隆型追踪, 并辅助预测抗体的抗原特异性或潜在的生物学功能[108]. 特别是那些基于三维结构信息或大规模序列数据的深度学习模型, 为深入理解抗体结合的分子机制和指导后续的抗体优化提供了重要的理论依据[126]. 总之, 在抗体发现的新时代, AI将为耗时、昂贵的传统实验提供强有力的补充方法和辅助工具[125].

例如, 此前尚未有生物标志物能够较为精准地预测抗体-药物共轭物的疗效, 但基于AI的预测模型可以实现这一点[127]; 在肿瘤治疗领域, 基于AI预测的蛋白质扩散也成功发现了多种靶向PD-1的抗体[128]. 此外, 生成式AI模型, 例如扩散模型、生成对抗网络、变分自编码器等, 在抗体的从头设计领域取得了革命性的突破. 这些先进的AI模型能够学习大量已知抗体序列或结构的分布规律, 并据此生成具有潜在期望功能的全新抗体, 为无需预先免疫或筛选天然库的抗体发现开辟了新途径[129~131].

尽管AI技术在抗体发现领域展现出广阔的应用前景, 但其发展和应用仍面临诸多挑战, 其中包括对高质

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

量、大规模且多样化训练数据集的严重依赖，许多AI模型内部决策机制的“黑箱”特性所导致的可解释性问题，以及从计算预测结果到湿实验验证之间的有效转化等，这些都需要多个领域的研究人员共同努力来逐步克服[132,133].

5 新兴与特种抗体发现策略

随着对抗体功能和作用机制理解的不断深入，以及对特定类型抗体需求的日益增长，除了上述主流技术外，一系列新兴的或针对特种需求的抗体发现策略和平台也相继被开发出来.

5.1 转基因动物平台

为了从根本上克服传统杂交瘤技术产生的鼠源抗体的免疫原性问题，并直接获得经过体内生理环境筛选的全人源抗体，科学家们通过基因工程手段开发了多种能够表达人抗体基因的转基因动物平台，其中以转基因小鼠最为常用[134]. 这些转基因小鼠的鼠源抗体基因通常会通过基因打靶技术进行功能性失活，以抑制小鼠自身抗体的产生，同时将包含大量人抗体基因片段的人工染色体或大片段基因组DNA导入到小鼠的基因组中，并确保其能够功能性表达[135]. 当这些转基因小鼠受到特定抗原的刺激后，其B细胞能够利用导入的人抗体基因片段进行V(D)J基因的随机重排、体细胞高频突变，经历完整的B细胞发育和免疫应答过程，最终产生针对该免疫原的、具有多样化可变区序列和不同效应功能亚型的全人源单克隆抗体[136].

但是，转基因动物平台的构建、维护和使用成本通常较高，且由于导入的人抗体基因片段在小鼠体内的表达环境与真实人体内环境不完全相同，可能会出现免疫应答范围受限、产生的抗体库多样性不足、与天然人源抗体在某些细微特性上存在差异等问题.

5.2 针对挑战性靶点的策略

尽管抗体发现技术已取得巨大进步，但仍存在许多具有重要生理功能和药理学开发价值的蛋白质靶点，例如G蛋白偶联受体、离子通道、转运体等跨膜蛋白，以及某些具有高度动态构象、低免疫原性或位于隐蔽结构域的可溶性蛋白，因其结构复杂、在体外表达和纯化过程中难以保持天然构象、免疫原性较弱等特性，通常被认为是抗体发现领域的“难成药靶点”[137,138]. 传统的抗体发现方法，特别是那些依赖于纯化蛋白进行动物免疫或体外筛选的策略，在针对这些靶点时往往难以高效获得特异性抗体[139,140].

针对结构复杂的跨膜蛋白靶点，一种行之有效的策略是将表达该靶蛋白的完整细胞、细胞膜片段或经过基因工程改造的重组病毒样颗粒作为免疫原进行动物免疫，或者直接将这些形式的抗原用于体外筛选流程. 为了在体外实验条件下更好地呈现膜蛋白的天然构象，研究人员已经开发了多种抗原呈递与稳定化技术，例如将目标膜蛋白嵌入到病毒样颗粒的脂质双分子层结构中，或者利用两亲性聚合物将其从天然膜环境中直接提取出来并包裹，这些形式的抗原可用于后续的动物免疫、抗体库筛选或结构生物学研究[141]. 此外，基因免疫技术通过将编码目标蛋白的基因直接递送到宿主细胞内，使其能够原位表达目标抗原并诱导免疫应答，同样适用于难以获得足量高纯度活性蛋白或在体外纯化过程中极不稳定的膜蛋白[142].

对于某些由于空间位阻而难以通过常规IgG抗体有效靶向的隐蔽性表位，利用具有更小尺寸和独特结构优势的单域抗体，如来源于骆驼科动物的VHH抗体或来源于软骨鱼类的VNAR抗体，或者利用高度工程化改造的非抗体蛋白支架，也为攻克这些挑战性靶点提供了富有前景的治疗策略[143~145].

展望未来，针对挑战性靶点的抗体发现策略将更趋向于整合多种技术的优势，例如将高度稳定的抗原呈递技术与高通量单B细胞筛选平台、人工智能辅助抗体设计等相结合，进一步提高发现针对各类挑战性靶点抗体的成功率和效率[146].

5.3 双特异性、多特异性抗体的发现与构建

双/多特异性抗体能够同时识别两个或更多不同的表位或抗原, 介导多种新颖的治疗机制, 例如将免疫效应细胞桥联至肿瘤细胞表面以增强杀伤效果、同时阻断多条致病相关的细胞信号通路、促进治疗分子跨越生理屏障、通过结合不同表位提高对靶细胞的结合亲和力等，这已成为当前抗体药物研发领域中的热点方向之一[147,148]. 尽管双/多特异性抗体的最终形式主要依赖于复杂的蛋白质工程进行构建，但其每一个独立的抗原结合结构域的发现、筛选和亲和力成熟，仍然依赖于本文前述的各类抗体发现平台[149].

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

然而, 双/多特异性抗体的设计与开发面临诸多挑战, 其中包括如何确保不同重链和轻链之间的正确配对与组装, 如何有效减少非期望的同源二聚体副产物的形成, 如何优化其整体分子的稳定性, 如何建立高效的大规模生产工艺等. 为了加速开发, 一些新兴的策略也正在被积极探索, 例如利用体外展示平台直接构建双特异性格式的抗体文库, 或者通过计算生物学设计与高通量筛选技术相结合, 来快速评估不同分子形式的双特异性抗体的亲和力、特异性及可开发性[150].

5.4 合成生物学方法

合成生物学作为一门新兴的交叉学科, 其核心目标在于创建具有可预测、可控制、可编程预设功能的新型生物系统, 通过工程化改造乃至从头构建全新的生物部件、通路或细胞系统, 为抗体发现、功能优化、生产表达提供了全新的视角[151,152].

无细胞合成生物学平台, 通过在体外精确地组装转录与翻译所需的全部生物化学组分, 或者利用经过特殊处理的细胞裂解液, 能够实现蛋白质合成过程的精细控制和高通量生产, 并且可以用于构建完全体外的、模拟细胞环境的人工细胞或最小化生物系统, 以进行新型抗体的筛选或功能分析, 从而摆脱活细胞培养的复杂性和生长限制[153,154].

合成生物学的理念和技术也推动了完全从头设计、不依赖于天然抗体骨架的新型结合蛋白, 或被称为“合成抗体”的开发. 目前, 基于合成生物学的抗体从头设计已经取得了长足的进展, 例如结合深度学习设计的抗蛇毒蛋白[155], 利用预先训练的大语言模型从头合成SARS-CoV-2的抗体[156]等. 这些成功的案例都旨在突破天然免疫系统的限制, 探索更为广阔和未知的抗体空间[157].

6 不同抗体发现技术的比较与选择

面对多样化的抗体发现技术平台, 如何进行科学评估、比较并结合具体的研发需求作出最优的策略选择, 是抗体药物研发中至关重要的环节.

6.1 关键评价指标

在系统性地评估和比较不同的抗体发现技术平台时, 需要综合考量一系列要素, 包括关键技术参数、经济效益以及产出抗体的特性等(表1), 以便针对特定的研发目标、资源配置和预期成果作出最合适的选择[158]. 首先, 研发周期是衡量一个技术平台效率高低的重要指标, 对于需要快速响应突发公共卫生事件或力求加速新药研发的项目而言尤其关键. 其次, 成本效益考量, 涵盖了初期固定资产的投入、实验过程中的试剂耗材费用、人力资源成本等方面的总体开销, 这一指标直接影响到项目的经济可行性和可持续性[159,160]. 再者, 筛选通量和技术平台所能容纳的文库多样性, 直接决定了成功发现优质抗体的概率大小; 而最终获得抗体的种类, 特别是其物种来源及其分子形式, 对于后续的临床应用、工程化改造等步骤具有决定性的影响. 此外, 候选抗体的亲和力和特异性是衡量其潜在治疗效果的核心参数, 直接关系到其在体内的有效剂量、潜在的脱靶效应以及临床应用的安全性与有效性[161]. 最后, 可开发性也直接关系到该抗体分子能否成功地进行后续的制剂开发、临床试验和大规模的商业化应用.

6.2 针对不同需求的策略选择

实际的抗体发现策略选择, 必须基于对具体研发目标、可用资源配置、项目时间进度以及期望的抗体特性等多方面因素进行全面的权衡. 例如, 对于主要在基础研究中用作实验工具的抗体, 其对免疫原性的要求通常相对较低, 研发周期和直接成本可能是优先考虑的因素, 此时, 传统的杂交瘤技术或相对快速的噬菌体展示已经足够满足大部分需求; 然而, 对于旨在开发为新型治疗性药物的抗体, 则必须将获得高度人源化的抗体作为首要目标, 此时, 能够直接产出人源抗体的转基因动物平台、基于大规模人源抗体库的体外展示技术, 或直接从人体分离抗体基因的单B细胞技术通常是更为合适的选择.

此外, 如果对最终获得的候选抗体的某些关键特性有极高的要求或特定的期望, 那么可能需要优先选择那些能够充分利用体内亲和力成熟机制(如转基因动物、基于免疫抗体库的展示技术、单B细胞技术)的技术平台, 或者那些可以进行精细功能性筛选(如结合FACS的酵母展示或哺乳动物细胞展示技术)的策略, 并且通常还需要结合后续的工程化改造来最终达到目标.

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

表 1 不同抗体发现技术关键评价指标对比
Table 1 Comparison of key evaluation indicators for different antibody discovery technologies

关键评价指标	杂交瘤技术	噬菌体展示	酵母展示	核糖体展示	单B细胞技术	转基因动物平台	AI辅助开发
研发周期	较长(通常3~6个月)	较短	相对较短	非常短(因无细胞培养)	非常快(数天至数周)	较长(需动物免疫周期)	较短
成本	初期投入相对较低, 但劳动强度大	相对较低	较高(需FACS等设备)	试剂成本较高	较高(依赖精密设备和试剂)	平台开发和维护成本高	前期训练和学习成本较高
文库筛选通量	低	极高(10^7~10^{11})	高(10^7~10^9)	极高(10^{12}~10^{14})	高(可达数万至百万细胞)	中等(依赖于后续分离技术)	高
抗体来源	鼠源(主要)或兔源	人源、鼠源、合成库等	人源、合成库等	DNA/mRNA模板来源(任意)	人源、鼠源等(来自免疫个体)	全人源(来自人源化动物)	现有抗体改造或从头合成
天然重轻链配对	是	否	否	否	是	是	否
体内亲和力成熟	是	否	否	否	是	是	否
关键优势	产生完整、天然配对的IgG; 产物经体内亲和力成熟; 技术经典、稳定	文库容量巨大; 周期短, 成本相对低; 可筛选非免疫原性/毒性靶点	真核表达, 有利于折叠和修饰; 可结合FACS进行定量和功能筛选; 亲和力成熟效率高	文库容量最大; 完全体外操作, 无细胞偏倚; 便于体外进化	发现速度极快; 获取天然重链轻链配对; 产物经体内亲和力成熟; 适合发现针对复杂靶点的抗体	直接产生全人源抗体, 产物经体内亲和力成熟且可开发性好	效率较高, 节省大量人工成本; 可以生成全新的抗体序列
主要局限性	周期长, 通量低; 鼠源免疫原性强; 难以处理某些“困难”靶点	原核表达, 缺乏翻译后修饰; 可能丢失天然配对; scFv/Fab转IgG格式可能出问题	操作较复杂, 需昂贵设备(FACS)	技术要求高, 对RNase敏感; 复合物不稳定; 试剂成本高	难以捕获极稀有B细胞; 成本高, 依赖昂贵设备; 单细胞PCR效率和偏倚问题	平台开发和维护成本高; 动物免疫周期长; 可能存在免疫应答受限	前期的开发和训练周期较长; 计算预测向湿实验的转化效率有待提高

值得强调的是, 在复杂的抗体研发项目中, 最佳的策略往往不是依赖单一技术平台，而是巧妙地整合多种技术的优势，例如可以首先利用转基因小鼠在体内产生人源抗体库，再通过高通量的单B细胞技术进行筛选和亲和力成熟，最后结合计算生物学方法进行可开发性评估和序列优化，从而形成一个高效、互补的综合性研发管线.

7 挑战与未来展望

7.1 当前面临的挑战

抗体发现技术在过去数十年间取得了令人瞩目的发展，成功催生了众多改变临床实践的治疗性抗体药物，但该领域在迈向更广应用和更深理解的征途中, 仍面临一系列持续存在的固有挑战.

缩短从靶点确认到候选药物产生的研发周期、提升针对特定靶点获得理想抗体分子的成功率，并在此过程中有效地控制成本，是整个生物医药行业在抗体研发领域共同追求的核心目标. 目前，主流的抗体筛选策略主要基于抗原结合亲和力或表观结合信号的强度, 然而, 如何能够更直接、更高效地筛选出那些能够介导特定生物学功能的抗体分子，仍然是一个需要不断创新的环节[162].

再者, 候选抗体分子的可开发性问题, 仍然是导致许多具有优良生物学活性的抗体在临床阶段遭遇失败的主要原因之一. 因此, 如何在抗体发现的早期就准确预测并优化这些关键的可开发性参数至关重要[163].

此外，尽管双特异性抗体、单域抗体等新型抗体形式具有独特的治疗优势，但其高效的发现、精确的分子设计、复杂的工程化改造以及大规模生产工艺的开发，仍然面临着各自领域内独特的技术挑战，例如, 如何确保双特异性抗体中不同链的正确配对、如何克服某些小型抗体片段在体内半衰期较短等问题[164,165].

最后，如何能够有效地针对那些传统意义上被认为是“不可成药”或“难以成药”的复杂靶点，成功开发出具有高特异性、高亲和力的抗体，仍然是当前抗体药物研发领域最具挑战性的前沿课题之一.

7.2 未来发展趋势

面对当前抗体发现领域存在的诸多挑战，以及未

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

来精准医疗的临床需求, 全球的抗体发现技术正朝着更高效、更智能、更个性化的方向持续革新, 多种前沿技术的交叉应用将是推动该领域在未来取得突破性进展的核心驱动力.

人工智能和机器学习算法将与高通量自动化实验平台进行更深层次的融合, 不仅将广泛应用于海量组学数据的分析、复杂模式的识别和生物学意义挖掘, 还将日益赋能抗体的设计与优化、抗原表位的精确预测、整个抗体发现与筛选流程的智能化决策, 最终目标是实现高度自动化、智能化的下一代抗体发现流程.

而随着对个体化免疫组库特征认识的不断加深, 结合更为快速、经济的抗体发现技术和生产工艺, 开发针对每一位患者独特病理特征的个性化抗体药物将逐渐从概念走向现实, 有望为癌症、自身免疫病等多种复杂疾病提供更为精准、高效且副作用更低的个体化治疗.

最后, 合成生物学方法, 包括引入非天然氨基酸、从头设计全新的蛋白、构建超大规模的全合成抗体文库等, 将持续推动完全人工创造的、具有独特结构和功能的抗体的开发, 这些新型分子有望克服传统抗体的某些固有局限性, 展现出更广泛的治疗潜力.

展望未来, 抗体发现技术的发展将更加突出多平台技术之间的协同整合与优势互补. 人们有充分的理由相信, 凭借持续不断的技术创新、多学科知识的深度融合以及全球科研人员与产业界的紧密协作, 抗体研究与应用领域在未来必将取得更多激动人心的进展, 为满足日益增长的临床需求、攻克人类面临的重大疾病、提升全球健康福祉, 持续贡献巨大的力量与价值.

参考文献

1 Hematianlarki M, Nimmerjahn F. Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of immunoglobulin G antibodies. Immunol Rev, 2024, 328: 372–386

2 Yu X, Zhang H, Zhou T, et al. A non-classical view of antibody properties: allosteric effect between variable and constant regions. Biotechnol Adv, 2025, 78: 108482

3 El Salamouni N S, Cater J H, Spenkelink L M, et al. Nanobody engineering: computational modelling and design for biomedical and therapeutic applications. FEBS Open Bio, 2025, 15: 236–253

4 Chothia C, Lesk A M. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol, 1987, 196: 901–917

5 McConnell S A, Casadevall A. New insights into antibody structure with implications for specificity, variable region restriction and isotype choice. Nat Rev Immunol, 2025, 25: 621–632

6 Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol, 2014, 5: 520

7 Klasse P J. Neutralization of virus infectivity by antibodies: old problems in new perspectives. Adv Biol, 2014, 2014: 1–24

8 Buyukgolcigezli I, Tenekeci A K, Sahin I H. Opportunities and challenges in antibody-drug conjugates for cancer therapy: a new era for cancer treatment. Cancers, 2025, 17: 958

9 Mbani C J, Morvan C, Nekoua M P, et al. Enterovirus antibodies: friends and foes. Rev Med Virol, 2024, 34: e70004

10 Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. Immunol Rev, 2015, 268: 25–51

11 Talmage D W. Allergy and immunology. Annu Rev Med, 1957, 8: 239–256

12 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975, 256: 495–497

13 Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science, 1985, 228: 1315–1317

14 McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, 1990, 348: 552–554

15 Hoogenboom H R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1105–1116

16 Boder E T, Wittrup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. Nat Biotechnol, 1997, 15: 553–557

17 Hanes J, Plückthun A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4937–4942

18 Tiller T, Meffre E, Yurasov S, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

expression vector cloning. J Immunol Methods, 2008, 329: 112–124
19 Georgiou G, Ippolito G C, Beausang J, et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. Nat Biotechnol, 2014, 32: 158–168
20 Greiff V, Miho E, Menzel U, et al. Bioinformatic and statistical analysis of adaptive immune repertoires. Trends Immunol, 2015, 36: 738–749
21 Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 2021, 596: 583–589
22 Prihoda D, Maamary J, Waight A, et al. BioPhi: a platform for antibody design, humanization, and humanness evaluation based on natural antibody repertoires and deep learning. mAbs, 2022, 14: e2020203
23 Hnasko R M , Stanker L H. Hybridoma technology. In: ELISA: Methods and Protocols, 2015, 1318: 15–28
24 Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Methods enzymol, 1981, 73(Pt B): 3–46
25 Littlefield J W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. Science, 1964, 145: 709–710
26 Guo H D, Tergel, Shang A P, et al. Establishment and identification of HGPRT deficient Hela cell line (in Chinese). Chin J Cell Biol, 2013, 35: 170–174 [郭惠东, 特日格乐, 尚爱萍, 等. Hela细胞HGPRT缺陷型细胞系构建. 中国细胞生物学学报, 2013, 35: 170–174]
27 Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 1971, 8: 871–874
28 Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. Immunotherapy, 2011, 3: 371–380
29 Mitra S, Tomar P C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. J Genet Eng Biotechnol, 2021, 19: 159
30 Moraes J Z, Hamaguchi B, Braggion C, et al. Hybridoma technology: is it still useful? Curr Res Immunol, 2021, 2: 32–40
31 Horspool A M, Sen-Kilic E, Malkowski A C, et al. Development of an anti-*Pseudomonas aeruginosa* therapeutic monoclonal antibody WVDC-5244. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1117844
32 Hassani D, Amiri M M, Mohammadi M, et al. A novel tumor inhibitory hybridoma monoclonal antibody with dual specificity for HER3 and HER2. Curr Res Transl Med, 2021, 69: 103277
33 Liao B, Yang S, Geng L, et al. Development of a therapeutic monoclonal antibody against circulating adipocyte fatty acid binding protein to treat ischaemic stroke. Br J Pharmacol, 2024, 181: 1238–1255
34 Nelson P N, Reynolds G M, Waldron E E, et al. Monoclonal antibodies. J Clin Pathol Mol Pathol, 2000, 53: 111–117
35 Carter P J. Potent antibody therapeutics by design. Nat Rev Immunol, 2006, 6: 343–357
36 Schroff R W, Foon K A, Beatty, S M, et al. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res, 1985, 45: 879–885
37 Klee G G. Human anti-mouse antibodies. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124: 921–923
38 Arana C, Garcia-Busquets A, Nicoli M, et al. Chimeric HLA antibody receptor T cell therapy for humoral transplant rejection. Nephrol Dial Transplant, 2024, 40: 19–26
39 Chan A C, Martyn G D, Carter P J. Fifty years of monoclonals: the past, present and future of antibody therapeutics. Nat Rev Immunol, 2025, 25: 745–765
40 Baudou F G, Herrera M, Vargas M, et al. Immunization of rabbits with nanovenom composed of *Dendroaspis polylepis* venom and silica nanoparticles: a first *in vivo* approach. Toxicon, 2025, 264: 108462
41 Hui Xian T, Parasuraman S, Yean Yean C, et al. Challenges and considerations in selecting animal models for evaluating a live, coldchain-free, dual-use vaccine (MyChol) for diarrhoeal diseases: a comprehensive review. MJMS, 2024, 31: 41–55
42 Plückthun A, Schaffitzel C, Hanes J, et al. *In vitro* selection and evolution of proteins. Adv Protein Chem, 2000, 55: 367–403
43 Paschke M. Phage display systems and their applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 70: 2–11
44 Barbas C F III, Burton D R, Scott J K, et al. Phage Display: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
45 Winter G, Griffiths A D, Hawkins R E, et al. Making antibodies by phage display technology. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 433–455
46 Clackson T, Hoogenboom H R, Griffiths A D, et al. Making antibody fragments using phage display libraries. Nature, 1991, 352: 624–628
47 Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnert T P, et al. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol, 1991, 222: 581–597
48 de Haard H J, van Neer N, Reurs A, et al. A large non-immunized human fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. J Biol Chem, 1999, 274: 18218–18230
49 Persson M A, Caothien R H, Burton D R. Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning. Proc Natl

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

Acad Sci USA, 1991, 88: 2432–2436
50 Sidhu S S, Fellouse F A. Synthetic therapeutic antibodies. Nat Chem Biol, 2006, 2: 682–688
51 Knappik A, Ge L M, Honegger A, et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J Mol Biol, 2000, 296: 57–86
52 Tan Y, Tian T, Liu W, et al. Advance in phage display technology for bioanalysis. Biotechnol J, 2016, 11: 732–745
53 Griffiths A D, Malmqvist M, Marks J D, et al. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. EMBO J, 1993, 12: 725–734
54 Hoogenboom H R, de Bruïne A P, Hufton S E, et al. Antibody phage display technology and its applications. Immunotechnology, 1998, 4: 1–20
55 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. Nature, 1996, 380: 364–366
56 Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. Science, 1998, 279: 377–380
57 Lerner R A, Kang A S, Bain J D, et al. Antibodies without immunization. Science, 1992, 258: 1313–1314
58 Bradbury A R M, Sidhu S, Dübel S, et al. Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies. Nat Biotechnol, 2011, 29: 245–254
59 Hoet R M, Cohen E H, Kent R B, et al. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. Nat Biotechnol, 2005, 23: 344–348
60 Plückthun A, Skerra A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1989, 178: 497–515
61 Derda R, Tang S K Y, Li S C, et al. Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. Molecules, 2011, 16: 1776–1803
62 Bruin R, Spelt K, Mol J, et al. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. Nat Biotechnol, 1999, 17: 397–399
63 Wittrup K D. Protein engineering by cell-surface display. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 395–399
64 Boder E T, Wittrup K D. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. Methods Enzymol, 2000, 328: 430–444
65 Feldhaus M J, Siegel R W, Opresko L K, et al. Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. Nat Biotechnol, 2003, 21: 163–170
66 Pan X, de Souza M O, Figueiras F M, et al. Optimized single-cell gates for yeast display screening. Protein Eng Des Sel, 2025, 38: gzae018
67 Deweid L, Neureiter L, Englert S, et al. Directed evolution of a bond-forming enzyme: ultrahigh-throughput screening of microbial transglutaminase using yeast surface display. Chem Eur J, 2018, 24: 15195–15200
68 Habermann J, Happel D, Bloch A, et al. A competition-based strategy for the isolation of an anti-idiotypic blocking module and fine-tuning for conditional activation of a therapeutic antibody. Biotechnol J, 2024, 19: e202400432
69 Ming K, Hu Y, Zhu M, et al. Development of nanobodies against Staphylococcus enterotoxin B through yeast surface display. Int J Biol Macromol, 2023, 253: 126822
70 Traxlmayr M W, Obinger C. Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display. Arch Biochem Biophys, 2012, 526: 174–180
71 Chance R, Kang A S. Eukaryotic ribosome display for antibody discovery: a review. Hum Antibodies, 2024, 32: 107–120
72 Plückthun A. Ribosome display and related technologies. New York: Springer, 2012, 3–28
73 Lipovsek D, Plückthun A. *In-vitro* protein evolution by ribosome display and mRNA display. J Immunol Methods, 2004, 290: 51–67
74 Wang M R, He M Y. The rapid discovery of engineered antibodies. IDrugs, 2007, 10: 562–565
75 Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, et al. *In vitro* display technologies: novel developments and applications. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 400–405
76 Jermutus L, Honegger A, Schwesinger F, et al. Tailoring *in vitro* evolution for protein affinity or stability. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 75–80
77 Li R, Kang G, Hu M, et al. Ribosome display: a potent display technology used for selecting and evolving specific binders with desired properties. Mol Biotechnol, 2019, 61: 60–71
78 Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. Trends Biotechnol, 2005, 23: 150–156
79 John P, Sriram S, Palanichamy C, et al. A multifarious bacterial surface display: potential platform for biotechnological applications. Crit Rev

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

Microbiol, 2025, 51: 1015–1040
80 Dahlsson Leitao C, Ståhl S, Löfblom J. Surface-engineered bacteria in drug development. Microb Biotechnol, 2024, 17: e70033
81 Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren P Å, et al. Display of proteins on bacteria. J Biotechnol, 2002, 96: 129–154
82 Slavny P, Hegde M, Doerner A, et al. Advancements in mammalian display technology for therapeutic antibody development and beyond: current landscape, challenges, and future prospects. Front Immunol, 2024, 15: 1469329
83 Beerli R R, Bauer M, Buser R B, et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 14336–14341
84 Bowers P M, Horlick R A, Neben T Y, et al. Coupling mammalian cell surface display with somatic hypermutation for the discovery and maturation of human antibodies. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 20455–20460
85 Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science, 2003, 301: 1374–1377
86 Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. Trends Immunol, 2021, 42: 1143–1158
87 DeKosky B J, Ippolito G C, Deschner R P, et al. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. Nat Biotechnol, 2013, 31: 166–169
88 Smith K, Garman L, Wrammert J, et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. Nat Protoc, 2009, 4: 372–384
89 Wrammert J, Smith K, Miller J, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. Nature, 2008, 453: 667–671
90 Brouwer P J M, Caniels T G, van der Straten K, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. Science, 2020, 369: 643–650
91 Fischer K, Lulla A, So T Y, et al. Rapid discovery of monoclonal antibodies by microfluidics-enabled FACS of single pathogen-specific antibody-secreting cells. Nat Biotechnol, 2025, 43: 960–970
92 Ado S, Dong C, Attaf N, et al. FB5P-seq-mAbs: monoclonal antibody production from FB5P-seq libraries for integrative single-cell analysis of B cells. Front Immunol, 2024, 15: 1505971
93 Weitkamp J H, Kallewaard N, Kusuhara K, et al. Generation of recombinant human monoclonal antibodies to rotavirus from single antigen-specific B cells selected with fluorescent virus-like particles. J Immunol Methods, 2003, 275: 223–237
94 Whittle J R R, Wheatley A K, Wu L, et al. Flow cytometry reveals that H5N1 vaccination elicits cross-reactive stem-directed antibodies from multiple Ig heavy-chain lineages. J Virol, 2014, 88: 4047–4057
95 Wang X, Kong H, Chu B, et al. Identification of a broad-inhibition influenza neuraminidase antibody from pre-existing memory B cells. Cell Host Microbe, 2025, 33: 151–166.e8
96 Lin C, Yang Q, Huang L, et al. Elucidating the characteristics and clonal evolutionary trajectory of influenza neuraminidase broadly reactive B cell. Sci Adv, 2025, 11: eadx4810
97 Schardt J S, Pornnoppadol G, Desai A A, et al. Discovery and characterization of high-affinity, potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies via single B cell screening. Sci Rep, 2021, 11: 20738
98 Zheng Y, Song K, Cai K, et al. B-cell-epitope-based fluorescent quantum dot biosensors for SARS-CoV-2 enable highly sensitive COVID-19 antibody detection. Viruses, 2022, 14: 1031
99 Janetzki S, Rabin R. Enzyme-linked ImmunoSpot (ELISpot) for single-cell analysis. Methods Mol Biol, 2015, 1346: 27–46
100 Hwai H, Chen Y Y, Tzeng S J. B-cell ELISpot assay to quantify antigen-specific antibody-secreting cells in human peripheral blood mononuclear cells. Methods Mol Biol, 2018, 1808: 133–141
101 Viri V, Duxbury Z, Scalliet G, et al. Microfluidics for high-throughput screening and directed evolution in agrochemical R&D. Chimia (Aarau), 2025, 79: 384–389
102 Zheng B, Yang Y, Chen L, et al. B-cell receptor repertoire sequencing: deeper digging into the mechanisms and clinical aspects of immune-mediated diseases. iScience, 2022, 25: 105002
103 Shiakolas A R, Kramer K J, Johnson N V, et al. Efficient discovery of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies via B cell receptor sequencing and ligand blocking. Nat Biotechnol, 2022, 40: 1270–1275
104 Wang Y, Li R, Tong R, et al. Integrating single-cell RNA and T cell/B cell receptor sequencing with mass cytometry reveals dynamic trajectories

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

of human peripheral immune cells from birth to old age. Nat Immunol, 2025, 26: 308–322
105 Prabakaran P, Glanville J, Ippolito G C. Editorial: next-generation sequencing of human antibody repertoires for exploring B-cell landscape, antibody discovery and vaccine development. Front Immunol, 2020, 11: 1344
106 Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. Nat Rev Genet, 2019, 20: 257–272
107 Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. Nat Rev Immunol, 2018, 18: 35–45
108 Wu I E, Kalejaye L, Lai P K. Machine learning models for predicting monoclonal antibody biophysical properties from molecular dynamics simulations and deep learning-based surface descriptors. Mol Pharm, 2024, 22: 142–153
109 Bai G G, Sun C C, Guo Z, et al. Accelerating antibody discovery and design with artificial intelligence: recent advances and prospects. Semin Cancer Biol, 2023, 95: 13–24
110 Amir A, Taussig D, Bitton A, et al. Antibody isolation from human synthetic libraries of single-chain antibodies and analysis using NGS. Methods Mol Biol, 2023, 2702: 347–372
111 Walker L M, Shiakolas A R, Venkat R, et al. High-throughput B cell epitope determination by next-generation sequencing. Front Immunol, 2022, 13: 855772
112 Młokosiewicz J, Deszyński P, Wilman W, et al. AbDiver: a tool to explore the natural antibody landscape to aid therapeutic design. Bioinformatics, 2022, 38: 2628–2630
113 Lowden M J, Lei E K, Hussack G, et al. Applications of high-throughput DNA sequencing to single-domain antibody discovery and engineering. Methods Mol Biol, 2023, 2702: 489–540
114 de Souza M O, Madan B, Teng I T, et al. Mapping monoclonal anti-SARS-CoV-2 antibody repertoires against diverse coronavirus antigens. Front Immunol, 2022, 13: 977064
115 Erasmus M F, Ferrara F, D'Angelo S, et al. Insights into next generation sequencing guided antibody selection strategies. Sci Rep, 2023, 13: 18370
116 Miho E, Yermanos A, Weber C R, et al. Computational strategies for dissecting the high-dimensional complexity of adaptive immune repertoires. Front Immunol, 2018, 9: 224
117 Hummer A M, Abanades B, Deane C M. Advances in computational structure-based antibody design. Curr Opin Struct Biol, 2022, 74: 102379
118 Guest J D, Vreven T, Zhou J, et al. An expanded benchmark for antibody-antigen docking and affinity prediction reveals insights into antibody recognition determinants. Structure, 2021, 29: 606–621.e5
119 Apgar J R, Mader M, Agostinelli R, et al. Beyond CDR-grafting: structure-guided humanization of framework and CDR regions of an anti-myostatin antibody. mAbs, 2016, 8: 1302–1318
120 Leman J K, Weitzner B D, Lewis S M, et al. Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. Nat Methods, 2020, 17: 665–680
121 Mason D M, Friedensohn S, Weber C R, et al. Optimization of therapeutic antibodies by predicting antigen specificity from antibody sequence via deep learning. Nat Biomed Eng, 2021, 5: 600–612
122 Jain T, Sun T, Durand S, et al. Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114: 944–949
123 Raybould M I J, Marks C, Krawczyk K, et al. Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 4025–4030
124 Xu X, Xu T, Zhou J, et al. AB-Gen: antibody library design with generative pre-trained transformer and deep reinforcement learning. Genomics Proteomics BioInf, 2023, 21: 1043–1053
125 Cheng J, Liang T, Xie X Q, et al. A new era of antibody discovery: an in-depth review of AI-driven approaches. Drug Discov Today, 2024, 29: 103984
126 Michalewicz K, Barahona M, Bravi B. ANTIPASTI: interpretable prediction of antibody binding affinity exploiting normal modes and deep learning. Structure, 2024, 32: 2422–2434.e5
127 Loi S, Salgado R. AI-driven biomarkers for antibody-drug conjugates. Cancer Cell, 2025, 43: 1000–1002
128 Ford C T. PD-1 targeted antibody discovery using AI protein diffusion. Technol Cancer Res Treat, 2024, 23: 15330338241275947
129 He X H, Li J R, Xu J, et al. AI-driven antibody design with generative diffusion models: current insights and future directions. Acta Pharmacol Sin, 2025, 46: 565–574
130 Zhao W B, Luo X W, Tong F, et al. Improving antibody optimization ability of generative adversarial network through large language model.

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

Comput Struct Biotechnol J, 2023, 21: 5839–5850
131 Salimi A, Jang J H, Lee J Y. Leveraging attention-enhanced variational autoencoders: novel approach for investigating latent space of aptamer sequences. Int J Biol Macromol, 2024, 255: 127884
132 Stokes J M, Yang K, Swanson K, et al. A deep learning approach to antibiotic discovery. Cell, 2020, 180: 688–702.e13
133 Vamathevan J, Clark D, Czodrowski P, et al. Applications of machine learning in drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18: 463–477
134 Brüggemann M, Osborn M J, Ma B, et al. Human antibody production in transgenic animals. Arch Immunol Ther Exp, 2015, 63: 101–108
135 Chen J, Liao S, Xiao Z, et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. Front Immunol, 2022, 13: 1007579
136 Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1117–1125
137 Heilker R, Wolff M, Tautermann C S, et al. G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. Drug Discov Today, 2009, 14: 231–240
138 Overington J P, Al-Lazikani B, Hopkins A L. How many drug targets are there? Nat Rev Drug Discov, 2006, 5: 993–996
139 Douthwaite J A, Finch D K, Mustelin T, et al. Development of therapeutic antibodies to G protein-coupled receptors and ion channels: opportunities, challenges and their therapeutic potential in respiratory diseases. Pharmacol Ther, 2017, 169: 113–123
140 Scott A M, Wolchok J D, Old L J. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer, 2012, 12: 278–287
141 Dörr J M, Scheidelaar S, Koorengevel M C, et al. The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. Eur Biophys J, 2016, 45: 3–21
142 Liu M A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. Immunol Rev, 2011, 239: 62–84
143 Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 775–797
144 Löfblom J, Feldwisch J, Tolmachev V, et al. Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. FEBS Lett, 2010, 584: 2670–2680
145 Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2015, 55: 489–511
146 Hutchings C J. A review of antibody-based therapeutics targeting G protein-coupled receptors: an update. Expert Opin Biol Ther, 2020, 20: 925–935
147 Herrera M, Pretelli G, Desai J, et al. Bispecific antibodies: advancing precision oncology. Trends Cancer, 2024, 10: 893–919
148 Yang H M. Recent advances in antibody therapy for Alzheimer's disease: focus on bispecific antibodies. Int J Mol Sci, 2025, 26: 6271
149 Husain B, Ellerman D. Expanding the boundaries of biotherapeutics with bispecific antibodies. BioDrugs, 2018, 32: 441–464
150 Karbyshev M S, Kalashnikova I V, Dubrovskaya V V, et al. Trends and challenges in bispecific antibody production. J Chromatogr A, 2025, 1744: 465722
151 Benner S A, Sismour A M. Synthetic biology. Nat Rev Genet, 2005, 6: 533–543
152 Slaton E W, Clay N, Phan N, et al. Innovations in yeast synthetic biology: engineered discovery systems for immunotherapy. ACS Synth Biol, 2025, 14: 3293–3305
153 Bogatyr V G, Wuite G J L. Challenges in observing transcription-translation for bottom-up synthetic biology. QRB Discov, 2025, 6: e5
154 Thurm A R, Janer Carattini G L, Bintu L. Human synthetic biology and programmable gene regulation control. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2025, 26: 139–161
155 Vázquez Torres S, Benard Valle M, Mackessy S P, et al. *De novo* designed proteins neutralize lethal snake venom toxins. Nature, 2025, 639: 225–231
156 He H, He B, Guan L, et al. *De novo* generation of SARS-CoV-2 antibody CDRH3 with a pre-trained generative large language model. Nat Commun, 2024, 15: 6867
157 Bachhav B, de Rossi J, Llanos C D, et al. Cell factory engineering: challenges and opportunities for synthetic biology applications. Biotech Bioeng, 2023, 120: 2441–2459
158 de Brito P M, Saruga A, Cardoso M, et al. Methods and cell-based strategies to produce antibody libraries: current state. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105: 7215–7224
159 Keesari P R, Samuels D, Vegivinti C T R, et al. Navigating the economic burden of multiple myeloma: insights into cost-effectiveness of CAR-T

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311

and bispecific antibody therapies. Curr Hematol Malig Rep, 2025, 20: 3
160 Wu A C, Fuhlbrigge A L, Robayo M A, et al. Cost-effectiveness of biologics for allergic diseases. J Allergy Clin Immunol-Pract, 2021, 9: 1107–1117.e2
161 Van Regenmortel M H V. Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition. J Mol Recognition, 2014, 27: 627–639
162 Brekke O H, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2: 52–62
163 Xu Y, Wang D, Mason B, et al. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. mAbs, 2018, 11: 239–264
164 Kontermann R E. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. mAbs, 2012, 4: 182–197
165 Beck A, Goetsch L, Dumontet C, et al. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16: 315–337

Antibody discovery technology: innovation and outlook from classic to leading edge

TANG Jian & WANG PengFei*

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China
** Corresponding author, E-mail: pengfei_wang@fudan.edu.cn*

Antibodies, as core tools in life science research and clinical therapeutics, have witnessed revolutionary advancements in discovery technologies—evolving from the traditional hybridoma technique to modern high-throughput and intelligent platforms. This review systematically summarizes major progress in antibody discovery technologies. It begins with an elaboration of the foundational hybridoma technology, including its principles, advantages, and limitations, along with improvement strategies such as humanization. The article then shifts to various *in vitro* display technologies—such as phage, yeast, and ribosome display—with a focus on their core mechanisms, library construction, and screening strategies. The review further elaborates on the advantages and implementation approaches of single B-cell antibody technology, emphasizing its critical role in preserving natural heavy-light chain pairing information. Also explored are applications of next-generation sequencing in antibody repertoire analysis and dynamic tracking, as well as the cutting-edge role of computational biology and artificial intelligence in antibody design, optimization, and developability prediction. Additional topics include strategies for challenging targets, transgenic animal platforms, engineering of bispecific and multispecific antibodies, and the potential of synthetic biology in novel antibody development. Finally, by comparing key metrics across different technological platforms, the review outlines current challenges and anticipates future directions, including the integration of multiple technologies, AI-enabled development, and personalized antibody therapeutics. This comprehensive review provides technical insights and strategic guidance for antibody drug R&D, offering valuable reference for promoting innovation and clinical application of therapeutic antibodies.

antibody discovery, hybridoma, phage display, yeast display, single B-cell sorting, next-generation sequencing, computationally aided design

doi: 10.1360/SSV-2025-0311

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0311